



PCT

REC'D 30 JAN 2002

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

11 T

Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPCb539/91		POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02698		Date du dépôt international (jour/mois/année) 29/09/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 01/10/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A01K67/027			
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE ... et al.			
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 8 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>			
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport</li> <li>II <input checked="" type="checkbox"/> Priorité</li> <li>III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités</li> <li>VII <input checked="" type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale</li> <li>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale</li> </ul>			
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 20/04/2001		Date d'achèvement du présent rapport 25.01.2002	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Fonctionnaire autorisé  Julia, P  N° de téléphone +49 89 2399 8410 	

**I. Base du rapport**

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

**Description, pages:**

1-13                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-12                      version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description,      pages :
- ☐ des revendications,    n°s :
- ☐ des dessins,            feuilles :

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02698

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**II. Priorité**

1. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que les documents suivants n'ont pas été remis dans le délai prescrit :
- ☐ copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
- ☐ traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
2. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que la revendication de la priorité a été jugée non valable.

Pour les besoins du présent rapport, la date de dépôt international indiquée plus haut est donc considérée comme la date pertinente.

3. Observations complémentaires, le cas échéant :  
**voir feuille séparée**

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-12
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-12
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-12
	Non : Revendications

2. Citations et explications  
**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :  
**voir feuille séparée**

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02698

---

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :  
**voir feuille séparée**

**1. R marque additionnell concernant la partie II (priorité) :**

Le document de priorité se rapportant à la présente demande n'est pas disponible au moment de rédiger ce rapport d'examen préliminaire international (REPI). La présente analyse est basée sur l'hypothèse que toutes les revendications bénéficient d'un droit de priorité correspondant à la date de dépôt du document de priorité (01.10.99).

**2. Remarques supplémentaires concernant la partie V (déclaration raisonné concernant la nouveauté, l'activité inventive et l'applicabilité industrielle selon la Règle 66.2(a) (ii) )**

La demande décrit une méthode de reconstitution in vitro d'un embryon de mammifère non-humain (ongulés, tels les bovins, les ovins, les caprins, les porcins), caractérisée en ce qu'elle comprend le traitement du noyau diploïde d'une cellule donneuse somatique préalablement à son transfert dans un cytoplasme receveur (en état d'interphase et par microinjection ou par fusion, par exemple par un choc électrique), ledit traitement comprenant (a) la protéolyse ménagée des protéines non-histones (par une protéase à sérine, telles la trypsine ou la chymotrypsine), et (b) l'induction d'un gonflement isomorphe du dit noyau (par traitement par un polyanion, tel l'héparine, le sulfate de dextran, les acides polyaspartiques de PM supérieur à 20 kDa). Le noyau peut être contenu dans la cellule donneuse et ledit traitement comprend la perméabilisation de la membrane cytoplasmique de cette cellule (par des agents perméabilisants doux, tels la lysolécithine, la streptolysine, la saponine, la digitonine), à condition que les conditions d'utilisation n'induisent pas la lyse des cellules et préservent à la membrane plasmique un état compatible avec l'opération ultérieure de fusion avec l'ovocyte .

X. Vignon et al., C.R. Acad. Sci. Paris Sciences de la vie 1998, Vol. 321, 735-745 (D1) décrit l'utilisation de biopsies de muscle et de peau effectuées sur des foetus bovins et sur de jeunes veaux comme source de noyaux somatiques dans des expériences de clonage. Le document décrit un traitement du cytoplasme receveur pour réduire l'activité MFP (Maturing Promoting Factor) (page 737-738), ainsi que l'effet désavantageux ou l'inconvénient d'une condensation prématurée des chromosomes (page 744). Cependant, ce document ne contient aucune allusion ou indication concernant les étapes spécifiques, qui définissent la méthode revendiquée.

Le document KHS Campbell et al., Biol. Reprod. 1993, Vol. 49, pages 933-942 (**D2**) apporte un enseignement similaire (niveau du MFP dans la cellule receveuse et condensation du DNA de la cellule donneuse) avec des références additionnelles au gonflement du noyau de la cellule donneuse (page 933), à la membrane nucléaire (pages 932-933), etc.... Le document FZ Sun et RM Moor, Current Topics in Developmental Biology, 1995, Vol. 30, pages 147-176 (**D3**) décrit d'une manière générale l'importance du gonflement du noyau de la cellule donneuse ainsi que la condensation de la chromatine, etc... (particulièrement pages 154-155 "nuclear remodeling").

Le document RL Brown et al., Exp. Cell Res. 1997, Vol. 104, pages 207-213 (**D4**) décrit la synthèse d'ADN après un traitement de protéolyse des cellules CHO (lysées ou non-lysées et avec le noyau au stade G1) en utilisant des concentrations de protéase (trypsine) très faibles (apparemment par l'activation directe de l'ADN polymérase). L'effet d'un traitement des noyaux cellulaires par des polyanions est aussi décrit dans le document RJ Kraemer et DS Coffey, Biochim. Biophys. Acta 1970, Vol. 224, pages 568-578 (**D5**). Selon ce document, l'héparine, le sulfate de dextran et les acides polyaspartiques produisent spécifiquement un gonflement des noyaux cellulaires ainsi que la synthèse et l'accumulation d'ADN. Cet effet est complètement annulé lorsque les noyaux sont lysés (effet du magnésium, page 574).

Aucun de ces documents ne fait référence à la possible importance de ces traitements pour transférer les noyaux ainsi traités dans un cytoplasme receveur. L'objet de la présente demande est nouveau et le jeu de revendication est considéré comme faisant preuve d'activité inventive (Articles 33 (2) et (3) PCT).

**3. Remarques supplémentaires concernant la partie VII (irrégularités dans la demande internationale) :**

Afin d'éviter toute erreur d'interprétation et par souci de clarté, les références contenues dans la description concernant des embryons, animaux, etc... doivent être toujours formulées en termes clairs (non-humain) et ne prêtant pas à équivoque dans l'esprit de l'homme du métier.

**4. Remarques supplémentaires concernant la partie VIII (certaines observations concernant la demande internationale, article 6 PCT)**

L'ACEPI considère que les revendications ne contiennent pas toutes les caractéristiques techniques nécessaires à définir l'invention (PCT, Directives pour l'examen préliminaire, Section IV, III-4.4). En particulier :

i) la méthode de reconstitution revendiquée ne caractérise pas la cellule receveuse. Par contre, la description et en particulier les exemples définissent toujours cette cellule receveuse comme un ovocyte. La demande n'apporte aucune preuve évidente ou démonstration technique que la méthode revendiquée peut tout aussi bien fonctionner avec un autre type de cellule receveuse (lequel??) (voir aussi l'état de la technique cité dans le rapport de recherche).

ii) d'après la description (page 5), quand le noyau est contenu dans la cellule donneuse et le traitement revendiqué comprend la perméabilisation de la membrane cytoplasmique de cette cellule, les conditions d'utilisation de ce traitement n'induisent pas la lyse des cellules et préservent à la membrane plasmique un état compatible avec l'opération ultérieure de fusion avec l'ovocyte receveur. Ces conditions ne sont pas signalés dans les revendications 8 et 9 (et le fait que cette perméabilisation est effectuée simultanément à la protéolyse; page 5-6 et exemples).

iii) de même, l'action de la protéase ne doit pas conduire à la lyse des noyaux, c'est à dire, les concentrations de protéase doivent être très faibles (page 6).

iv) d'après la description, le transfert des noyaux traités conformément aux méthodes de la demande peut être effectué quel que soit le stade du cycle cellulaire des cellules donneuses et quel que soit l'état du cytoplasme receveur. Néanmoins, dans tous les cas, il est essentiel d'avoir toujours un taux de MFP (Maturation Promoting Factor) inférieur à celui auquel il induit la dégradation de la membrane nucléaire et la condensation de la chromatine, c'est à dire, dans certains cas, un traitement pour réduire l'activité MFP serait nécessaire (page 7) (voir aussi l'état de la technique cité dans le rapport de recherche).

v) la culture in vitro des embryons reconstitués jusqu'à leur développement au stade blastocyte apparaît aussi comme une étape essentielle de la méthode revendiquée

(page 8).



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/089 454

R6

Applicant's or agent's file reference MJPcb539/91	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/02698	International filing date (day/month/year) 29 September 2000 (29.09.00)	Priority date (day/month/year) 01 October 1999 (01.10.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01K 67/027		
Applicant INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☒ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 20 April 2001 (20.04.01)	Date of completion of this report 25 January 2002 (25.01.2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02698

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-13, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-12, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02698

## II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:  
☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.  
☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

See annex

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

national application No.  
PCT/FR 00/02698

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II .

The priority document relating to the present application was not available at the time this International preliminary examination report (IPER) was written. The present report is based on the assumption that all the claims benefit from a right of priority as of the filing date of the priority document (01.10.99).

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/02698

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

The application describes a method for in vitro reconstruction of a non-human mammalian embryo (ungulates such as bovines, ovines, caprines, porcines), characterized in that said method includes treating the diploid nucleus of a somatic donor cell prior to the transfer thereof in a recipient cytoplasm (in interphase and by microinjection or by fusion, for example, by electric shock), said treatment comprising (a) controlled proteolysis of non-histone proteins (by a serin proteinase, such as trypsin or chymotrypsin), and (b) inducing an isomorphic swelling of said nucleus (via a treatment through a polyanion such as heparin, dextran sulfate, polyaspartic acids having a molecular weight exceeding 20kDa). The nucleus can be contained in the donor cell and said treatment comprises permeabilizing the cytoplasmic membrane of said cell (via mild permeabilizing agents such as lysolecithin, streptolysin, saponin, digitonin), as long as the use conditions do not induce lysis of cells and maintain the plasmic membrane in a state whereby subsequent fusion with the oocyte could occur.

X. Vignon et al., C.R. Acad. Sci. Paris Sciences de la Vie, 1998, Vol. 321, 735-745 (D1) describes the use of muscle and skin biopsies carried out on bovine fetuses and on young calves as a source of somatic nuclei in cloning experiments. The document describes treating the recipient cytoplasm to reduce the MFP activity (Maturing Promoting Factor) (page 737-738), as well as the disadvantageous effect or drawback of a premature condensation of the chromosomes (page 744). Nevertheless, the document does not suggest or mention the specific steps defining the claimed method.

The document KHS Campbell et al., Biol. Reprod. 1993, Vol. 49, pages 933-942 (D2) contains a similar teaching (level of MFP in the recipient cell and condensation of the donor cell DNA) with additional references to the swelling of the donor cell nucleus (page 933), to the nuclear membrane (pages 932-933), etc. Document FZ Sun and RM Moor, Current Topics in Developmental Biology, 1995, Vol. 30, pages 147-176 (D3) describes, in general terms, the significance of the swelling of the donor cell nucleus and the chromatin condensation, etc. (in particular, pages 154-155, "nuclear remodeling").

Document RL. Brown et al., Exp. Cell Res. 1997, Vol. 104, pages 207-213 (D4) describes DNA synthesis after proteolysis-treatment of the CHO cells (lyzed and non-lyzed and with the nucleus in the G1 phase) by using very weak protease concentrations (trypsin) (apparently through direct activation of the DNA polymerase). The effect of treating cell nuclei with polyanions is also described in the document RJ Kraemer and DS Coffey, Biochim. Biophys. Acta 1970, Vol. 224, pages 568-578 (D5). According to said document, heparin, dextran sulfate and polyaspartic

acids specifically produce a swelling of cell nuclei as well as DNA synthesis and accumulation. Said effect is completely cancelled in the case of lyzed nuclei (effect of magnesium, page 574).

None of these documents refers to the potential importance of said treatments for transferring nuclei that are thus treated in a recipient cytoplasm. The subject matter of the present application is novel and the set of claims is considered to involve an inventive step [PCT Article 33(2) and (3)].

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 00/02698

## VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

For the sake of clarity and of correct interpretation, the references in the description concerning embryos, animals, etc. must always be formulated in terms that are clear ("non-human") and not likely to be misinterpreted by a person skilled in the art.



**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The IPEA considers that the claims do not contain all the technical features necessary for defining the invention [PCT, Guidelines for preliminary examination, Section IV, III-4.4). In particular:

i) the reconstruction method claimed does not characterize the recipient cell. However, the description, and in particular, the examples, always define said recipient cell as an oocyte. The application does not provide any evidence or technical demonstration that the claimed method would be just as effective with another type of recipient cell (which type?) (see also the prior art cited in the International search report).

ii) according to the description (page 5), when the nucleus is contained in the donor cell and the claimed method includes the permeabilization of the cytoplasmic membrane of said cell, the conditions of use of said treatment do not induce lysis of the cells and maintain the plasmic membrane in a state compatible with subsequent fusion with the oocyte. Said conditions are not pointed out in Claims 8 and 9 (nor is the fact that said permeabilization is carried out simultaneously with proteolysis; page 5-6 and examples).

iii) also, the activity of the protease should not lead to the lysis of the nuclei, that is, the protease concentrations must be very weak (page 6).

iv) according to the description, the transfer of nuclei

## VIII. Certain observations on the international application

treated according to the methods of the application can be carried out regardless of the cell cycle stage of the donor cells and the state of the recipient cytoplasm. Nevertheless, in all cases, the level of MFP (Maturation Promoting Factor) should always be lower than the level at which it induces nuclear membrane degradation and chromatin condensation, that is, some cases would require a treatment for reducing the MFP activity (page 7) (see also the prior art cited in the International search report).

v) the in vitro culture of reconstructed embryos until the development thereof to the blastocyte stage also appears as an essential step in the claimed method (page 8).